

学校编码：10384

学号：200226050

分类号_____密级_____

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

视黄酸调节其受体 RAR α 的
泛素化和类泛素化

Regulation of Ubiquitination and Sumoylation of
Retinoic Acid Receptor by Retinoic Acid

作者姓名：林晓峰

指导教师姓名： 吴乔 教授

专 业 名 称：细胞生物学

论文提交日期：2005 年 7 月 12 日

论文答辩时间：2005 年 8 月 7 日

学位授予日期：

答辩委员会主席： 李祺福

评 阅 人：_____

2005 年 08 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的
研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研
究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担
由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

2005年 月 日

目 录

中文摘要	1
英文摘要	2
前言	
1 蛋白质的选择性降解机制 - 泛素/蛋白酶体降解系统.....	4
1.1 泛素/蛋白酶体系统的组成	4
1.2 泛素/蛋白酶体系统的需能降解途径	6
1.3 泛素/蛋白酶体途径相关的生物学功能	7
2 类泛素蛋白 - SUMO的翻译后修饰及其生物学功能	9
2.1 类泛素化途径的组成成份.....	9
2.2 类泛素化的生化反应途径	12
2.3 类泛素化的生物学功能	13
3 视黄酸的信号转导与调控机制	15
3.1 视黄酸及其功能	15
3.2 视黄酸受体家族成员	15
3.3 视黄酸的信号途径	18
3.4 蛋白质翻译后修饰对视黄酸受体转录活性的调控	20
4 本文的研究目的和意义.....	22
材 料 与 方 法	
1 材料.....	24
2 方法.....	26
2.1 细胞培养	26

2.2 RNA 提取与Northern Blots.....	26
2.3 蛋白提取与Western Blots	27
2.4 免疫共沉淀/Western Blotting.....	28
2.5 贴壁细胞的瞬时转染.....	28
2.6核蛋白的提取与凝胶阻抑测定.....	29
2.7氯霉素乙酰转移酶CAT 活性测定.....	29
2.8免疫荧光分析	30
2.9 脉冲 - 追踪 (Pulse-chase) 实验	30
结 果 与 分 析	
1 不同肿瘤细胞中ATRA对RAR α mRNA和蛋白的调节.....	32
2 不同肿瘤细胞中ATRA对RAR α 泛素化和类泛素化的影响.....	36
3 泛素/蛋白酶体途径介导RAR α 的降解.....	38
4 RAR α 泛素化降解减少其与RXR α 形成异源二聚体.....	40
5 类泛素化提高RAR α 蛋白稳定性并促进其与RXR α 形成异源二聚体.....	43
讨 论	47
参 考 文 献	51

TABLE OF CONTENTS

Abstract in Chinese.....	1
Abstract.....	2
Introduction	
1 Selective degradation system of proteins-the ubiquitin/proteasome pathway	4
1.1 Members of the ubiquitin/proteasome pathway.....	4
1.2 The ubiquitylation pathway.....	6
1.3 Biological function of ubiquitylation.....	7
2 Posttranslational modification of SUMO and its biological function	9
2.1 Members of the sumoylation pathway.....	9
2.2 The sumoylation pathway.....	12
2.3 Biological function of sumoylation.....	13
3 Singal transduction and regulation of retinoids pathway	15
3.1 Retinoid acids and their functions.....	15
3.2 Members of the retinoid acid family.....	15
3.3 Retinoids signal pathway.....	18
3.4 Regulation of posttranslational modification on retinoids transcriptional activity	20
4 Purpose of This Thesis.....	22
Materials and Methods	
1 Materials.....	24

2 Methods	26
2.1 Cell culture.....	26
2.2 RNA preparation and Northern Blotting	26
2.3 Protein preparation and Western blotting	27
2.4 Immunoprecipitation/Western blot analysis	28
2.5 Tansient transfection assay	28
2.6 Nuclear extract preparation and Gel retardation assay	29
2.7 CAT activity assay.....	29
2.8 Laser-scanning confocal microscopy	30
2.9 Pulse-chase experiment	30

Results

1 ATRA induced distinct patterns of alteration on transcriptional activity and protein synthesis of RARα in different cell lines	32
2 ATRA exerts diverse effects on RARα ubiquitination and sumoylation in different cell lines	36
3 Ubiquitin/proteasome pathway mediates RARα degradation	38
4 RARα ubiquitination/degradation decreases its heterodimerization with RXRα	40
5 Sumoylation increases the stability of RARα and facilitates heterodimerization of RARα with RXRα	43
Discussion and Conclusion	47
Reference	51

英文缩写注释 (按照论文出现先后顺序排列)

ATRA	all-trans retinoic acid
RAR	retinoic acid receptor
RXR	retinoid X receptor
E1	ubiquitin-activating enzyme
E2	ubiquitin-conjugating enzyme
E3	ubiquitin-protein ligating enzyme
UCHs	ubiquitin C-terminal hydrolases
Ub	Ubiquitin
UBLs	ubiquitin-like modifiers
UDPs	ubiquitin-domain proteins
SUMO	small ubiquitin-related modifier
Rub1	related to ubiquitin
RanBP2	Ran binding protein-2
Pc 2	human ploycomb group protein
PML	promyelocytic leukaemia protein
RA	Retinoid Acid
9-cis RA	9-cis retinoic acid
DBD	DNA Binding Domain
LBD	Ligand Binding Domain
RARE	RA responsive element
SMCC	Srb and Mediator protein containing complex
HRE	Hormone responsive Element
CHX	cycloheximide

摘 要

全反式视黄酸 (all-trans retinoic acid, ATRA) 是维生素A的衍生物, 在细胞增殖、分化和凋亡过程中起着重要作用。ATRA主要通过视黄酸受体(retinoic acid receptors, RARs) 和视黄素X受体(retinoid X receptors, RXRs)介导发挥功能。另外, 蛋白翻译后的修饰如磷酸化(phosphorylation)、泛素化(ubiquitination)和类泛素化(sumoylation)对于调节视黄酸受体活性起到了重要的作用。

本文研究发现, 在胃癌细胞(BGC-823)中, ATRA上调RAR α mRNA和蛋白表达水平。然而, 在乳腺癌细胞(MCF-7)中, ATRA对RAR α mRNA水平没有影响, 但下调其蛋白表达水平。免疫共沉淀/western blot分析表明, 尽管在两株肿瘤细胞中, RAR α 同时发生类泛素化和泛素化, 但是ATRA对RAR α 类泛素化和泛素化的调节作用不同。在MCF-7细胞中, ATRA增强RAR α 泛素化并通过泛素/蛋白酶体途径诱导RAR α 蛋白降解, 从而引起RAR α /RXR α 异源二聚体与DNA结合能力的下降, 导致RXR α 与RAR α 解离, 并从细胞核转运到胞浆。相反, 在BGC-823细胞中, ATRA增强RAR α 类泛素化, 使得RAR α 更加稳定, 从而提高RAR α /RXR α 异源二聚体与DNA的结合能力, 并稳定地定位在细胞核。

本文研究揭示了依赖RAR α 信号转导的调控新机制: 在乳腺癌细胞中通过泛素/蛋白酶体途径降解RAR α , 而在胃癌细胞中通过类泛素化途径稳定RAR α , 由此介导ATRA的信号转导。

关键词: 全反式视黄酸; 视黄酸受体; 泛素化; 类泛素化; 肿瘤细胞

Abstract

All-trans retinoic acid (ATRA) is a Vitamin A-derived retinoid , which plays an important role in regulating a broad range of biological processes including cell proliferation, differentiation and apoptosis through its receptors, RARs (retinoic acid receptors) and RXRs (retinoid X receptors). In addition, posttranscriptional modifications, such as phosphorylation, ubiquitination and sumoylation, also play an important role in regulation of retinoid receptor activity.

In this study, we found that ATRA up-regulated RAR α mRNA and protein expression in gastric cancer BGC-823 cells. However, in breast cancer MCF-7 cells it down-regulated RAR α protein expression with no effect on its RAR α mRNA. Immunoprecipitation/Western blot analysis showed that, although sumoylated and ubiquitinated RAR α existed simultaneously in both cancer cell lines, ATRA exerted different regulatory effects on sumoylation and ubiquitination of RAR α . In MCF-7 cells, ATRA treatment enhanced the ubiquitination of RAR α and the subsequent degradation of RAR α through the ubiquitin/proteasome pathway. This resulted in a reduction in the DNA binding activity of RAR α /retinoid X receptor α (RXR α) heterodimer, the separation of RXR α from RAR α and the translocation of RXR α from the nucleus to the cytoplasm. By contrast, in BGC-823 cells, ATRA augmented sumoylation, not ubiquitination, of RAR α . The stability of sumoylated RAR α was significantly stronger than in non-sumoylated RAR α . These results also showed an increase in the DNA binding activity of the RAR α /RXR α

heterodimer and the stability of nuclear localization of this heterodimer, which normally facilitates the ATRA signal transduction.

In conclusion, our results reveal a novel mechanism for the regulation of RAR α -dependent signal transduction through the ubiquitin/proteasome pathway in breast cancer cells and the sumoylation pathway in gastric cancer cells.

Keywords: All-trans retinoic acid (ATRA); Retinoid receptors ; Sumoylation ; Ubiquitination ; Cancer cell

前 言

1 蛋白质的选择性降解机制 - 泛素/蛋白酶体降解系统

蛋白质是生命活动的基本功能分子,几乎所有生命活动均需要蛋白质的参与。蛋白质的新陈代谢对生物体有着重要的影响,在细胞内,蛋白质处于合成(诞生)与降解(死亡)的动态平衡。所有机体组织细胞中都存在着溶酶体途径、钙蛋白酶系统、泛素/蛋白酶体途径和泛素非依赖性途径等多种蛋白降解途径。在泛素/蛋白酶体途径中,细胞给需要清除的蛋白质挂上“死亡标签”(多聚泛素链),在一系列酶作用下,该蛋白质被降解。泛素介导的蛋白酶体系统与蛋白质质量控制、细胞周期、DNA 修复、转录以及免疫应激等密切相关,也与许多种疾病的发生相关。迄今,至少有5次诺贝尔奖授予研究蛋白质如何“诞生”的科学家,而2004年的诺贝尔化学奖则授予了蛋白质“死亡”方面的研究成果,即:Ciechanover^[1]于1978年发现了泛素分子及调控泛素化的E1、E2、E3 酶,1980年Ciechanover^[2]和Hershko^[3]的研究又向人们揭示了泛素介导的蛋白质需能酶解途径,之后Rose^[4]在该领域内也作出了杰出贡献,他们三人共享诺贝尔化学奖的殊荣。

1.1 泛素/蛋白酶体系统的组成

泛素/蛋白酶体系统成分复杂,广泛存在于真核生物中,主要包括泛素、26S蛋白酶体、许多酶系统,如E1、E2、E3、泛素C-末端水解酶及其它一些蛋白酶等^[5-8]。

1) 泛素 (Ubiquitin)

泛素是一种小分子球蛋白,只含有 76 个氨基酸,分子量约 8.5KD^[9]。

目前发现所有生物的泛素都是由多基因编码的，而且它的序列相当保守，酵母与人的泛素只有 3 个氨基酸的差别。X 射线衍射分析表明泛素是一个紧密的球形结构，包括四个 β 片层和一个 α 螺旋，共形成三个半转角。随着研究的进展，又发现了许多类泛素蛋白，尽管它们也具有与蛋白底物结合的能力，但并不促进底物蛋白降解，可能与泛素作用相反或仅作为分子伴侣（在下文还将提到）。

2) 泛素活化酶 (ubiquitin-activating enzyme, E1)

E1 是催化泛素与蛋白底物结合所需的第一个酶，是细胞的活性和生存所必需的。E1 可能是由两个分子量各 105KD 亚基组成的二聚体。目前只发现了一种有功能的 E1。

3) 泛素转移酶 (ubiquitin-conjugating enzymes, E2s)

E2 是泛素与蛋白底物结合所需的第二个酶，现在至少有 30 种 E2 被分离纯化，多数 E2 为小分子量蛋白质，它们的共性是含有一个保守的 14-16KD 的核心区域，含有活性所需的半胱氨酸残基。许多 E2 就是在核心区域的基础上发生 C 末端和 N 末端的延伸。据此，E2 在结构上可分为 4 组，不同 E2 结构与功能均不同。E2 可能具有直接识别底物蛋白的能力，但目前证据极少。

4) 泛素-蛋白连接酶 (ubiquitin-protein ligating enzymes, E3s)

E3 是泛素与蛋白底物结合所需的第三个酶。E3 在决定泛素介导的底物蛋白降解的选择性方面具重要作用。目前对 E3 的了解很有限，不同类型的 E3 间缺乏序列同源性，而且分子量差异较大。但根据 E3 识别蛋白序列和信号的不同可将其分为 6 个亚型：E3 α ，HECT，APC，SCF 复合体，几种环指蛋白，pVHL。目前已被描述的 E3 数量较少，由于底物蛋白的多样性将有许多 E3 有待进一步被发现。

5) 蛋白酶体

蛋白酶体包括一个20S中心颗粒和一个或两个调节颗粒。20S蛋白酶体呈筒状外形，由内层2个 β 环和外层2个 α 环组成，每个环含7个亚基，基本结构为： $\alpha 1 \sim 7\beta 1 \sim 7\beta 1 \sim 7\alpha 1 \sim 7$ ^[10]。目前从不同物种中共发现了70多种亚基，每种亚基分子量约为25-35KD， α 亚基主要用于底物识别， β 亚基主要参与底物降解。不同物种，不同生理状态下，20S蛋白酶体活性强度不等。20S蛋白酶体活性调节因子主要有两种：19S调节复合体和11S调节复合体。调节复合体位于20S的两端或一端，如26S蛋白酶体中心为一个20S中心颗粒，两端各有一个19S调节颗粒。不同的调节复合体与20S蛋白酶体结合后功能不同，20S-19S主要参与降解泛素化蛋白，20S-PA28主要负责抗原提呈^[11]。高等生物的20S蛋白酶体的亚基组成可因机体功能状态的不同而变化。

6) 泛素 C 末端水解酶 (ubiquitin C-terminal hydrolases, UCHs)

UCHs多为含巯基蛋白酶，分子量大小不等，能特异识别泛素C末端区域，促进泛素再循环，所以对泛素系统的正常运行是必需的^[12]，目前对其作用尚未阐明。

另外，最近还发现一种新的酶—E4，它在少数底物泛素化反应中，对多聚泛素链的延长起重要作用^[13]。

1.2 泛素/蛋白酶体系统的需能降解途径

泛素化是一个依赖ATP的酶促反应，其介导的降解途径包括两个阶段^[14, 15]：1、泛素与蛋白质底物的相互作用；2、蛋白酶体对底物的降解。这两个阶段包括6个步骤。

第一阶段：泛素 (ub) 以 ATP 依赖的方式被激活，其 N 端羧基与 E1 的巯基形成硫羟酸酯结合，使 ub 与 E1 连接，消耗一分子 ATP，并释放一分子 AMP 和一分子焦磷酸；然后通过转酰基作用再将 ub 转移给

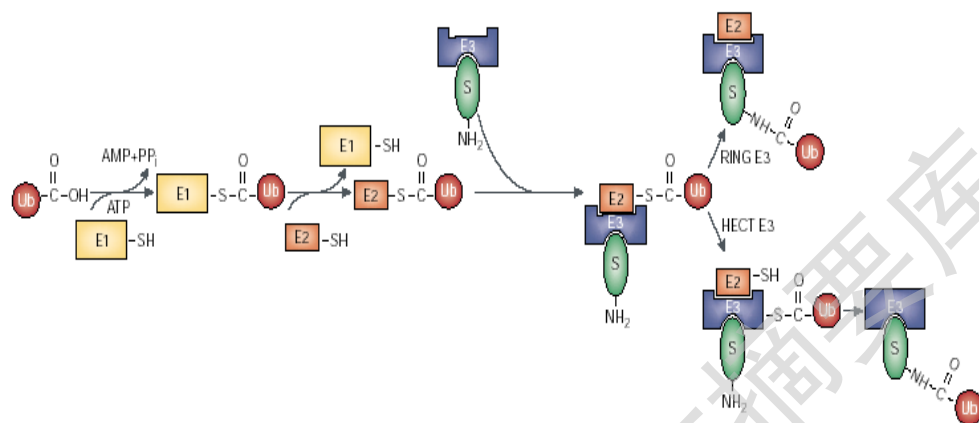


图 1，泛素的酶促反应过程^[14]

Fig.1 The ubiquitylation pathway

E2，释放出E1，形成高能键E2-ub复合物，E2再与E3连接。E3上一般连接有底物蛋白，被磷酸化、氧化、错误折叠或与辅助蛋白结合的蛋白质被E3s 识别并与之结合。如果E3含有HECT结构域，ub将被转运到HECT结构域中活化的半胱氨酸链上，接着再转运至底物上或与底物连接的多聚ub链结合；如果是RING E3，目前的证据表明，ub将直接从E2转到底物，此即E3非依赖的连接反应，其底物蛋白多是些碱性蛋白，如组蛋白。

第二阶段：底物泛素链与蛋白酶体 19 S 的泛素受体相互作用，蛋白质底物发生去折叠，并通过蛋白酶体受体端裂隙进入 26S 蛋白酶体的催化中心，底物蛋白质被多次切割，最后形成 3-22 个氨基酸残基的小肽。

在泛素 C 端水解酶、脱泛素酶和寡肽酶的作用下，释放出泛素分子，可再次参与循环。

1.3 泛素/蛋白酶体途径相关的生物学功能

泛素/蛋白酶体途径对通过对细胞蛋白的降解而在机体的许多生理功

能中都起到重要的作用^[16]，目前随着研究的深入还不断有新的作用被发现，主要作用如下：

1.3.1 转录的调控

转录因子NF- κ B在胞浆内与其抑制蛋白I κ B结合呈非活性状态，当受刺激剂后I κ B首先被I κ B磷酸化激酶磷酸化，然后被泛素/蛋白酶体途径降解，从而使NF- κ B活化进入核内与相应的DNA位点结合，调节多基因的转录^[17]。其它转录因子如E2F-1、Fos、Myc也都受泛素/蛋白酶体途径调节。

1.3.2 凋亡

近年来的研究表明泛素/蛋白酶体途径在调控细胞凋亡中也起到重要作用^[18]，一些与凋亡有关的调节因子如Bcl-2、Jun N末端激酶、热休克蛋白等也是通过蛋白酶体降解的。在一些实验中此途径是起促进凋亡的作用，而另一些实验中却起到相反的作用，对其在凋亡中的具体作用还有待进一步的研究。

1.3.3 细胞周期的调控

细胞周期受细胞周期调节因子依赖的激酶(Cdks)的活性所控制，而这类激酶的活性又受到一些正向调节亚单位、细胞周期调节因子的合成与降解及负向调节因子、Cdk抑制剂的浓度所控制。目前发现的G1 细胞周期蛋白、有丝分裂细胞周期蛋白、Cdk抑制剂 $p27^{Kip1}$ 及阻止同源染色体分离的蛋白Cut2 的降解都与泛素/蛋白酶体途径有关。

1.3.4 抗原提呈

抗原提呈细胞中内源性抗原被蛋白酶体摄取并降解成多肽，该多肽与内质网中合成的MHC-I类分子结合，所形成的多肽-MHC-I类分子复合物被高尔基体转运至细胞表面，供CD8⁺T细胞的TCR识别，并使之激活。

2 类泛素蛋白 - SUMO的翻译后修饰及其生物学功能

近年来,随着对泛素蛋白翻译后修饰的深入研究,越来越多的泛素蛋白被报道,各种类似泛素的修饰蛋白也不断地被发现,根据是否具有修饰功能可将类泛素蛋白分为两类^[19]: 泛素相似修饰物(ubiquitin-like modifiers, UBLs)和泛素结构域蛋白(ubiquitin-domain proteins, UDPs)。UBLs有SUMO(small ubiquitin-related modifier)、Rub1(related to ubiquitin, 或称Nedd8)、Apg8(autophagy)和Apg12等,具有类似于泛素化的修饰功能,它们通过异肽键(isopeptide bond)与底物蛋白连接,介导不同的生理反应,如Apg8参与自体吞噬过程,ISG15介导干扰素信号应答^[20], SUMO的功能将在下文详细介绍。UDPs仅具有与泛素分子序列相近的结构域,并无其他相关性,且不与其他蛋白共价连接,这类蛋白包括有parkin、RAD23、DSK2等。

具有修饰功能的SUMO与泛素在氨基酸序列上虽然只有18%相同,但核磁共振结果显示,它们在二级和三级结构上非常相似,如都有 β -sheet缠绕一个 α -helix的球状折叠,且参与反应的C端双甘氨酸残基的位置非常相似^[8]。类泛素化(sumoylation)与泛素化(ubiquitination)最大的不同在于,它并不促使蛋白降解,反而是加强蛋白的稳定表达或调节蛋白在细胞内的定位和分布,以及影响蛋白的转录活性^[21]。至今已发现30余种蛋白能被SUMO修饰,其中包括许多核转录因子和核激素受体如ER、AR、GR等^[22]。

2.1 类泛素化途径的组成成份

2.1.1 SUMO 的分类和结构

1995年, SUMO家族的第一个成员SMT3在酿酒酵母(Saccharomyces

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库